



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«Ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών στην φωσφοδιεστεράση 4 με  
απόκριση στην απρεμιλάστη σε ασθενείς με ψωρίαση»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΡΣΟΥ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019

**«Association analysis of polymorphisms in phosphodiesterase 4 with response to apremilast in patients with psoriasis»**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

**Σαραφίδου Θεολογία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής  
Ζωικών Οργανισμών

**Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

**Μούτου Αικατερίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας  
Σπονδυλωτών

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Θεολογία Σαραφίδου που μού ανέθεσε τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Την ευχαριστώ, επίσης, για την επικοινωνία και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της. Έπειτα, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Ζήση Μαμούρη και την κ. Αικατερίνη Μούτου για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τη Σοφία Αλεξούδα, κάτοχο μεταπτυχιακού διπλώματος, για τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια των πρώτων μου βημάτων στο εργαστήριο. Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές τους και για τη δημιουργία ενός ευχάριστου και δημιουργικού περιβάλλοντος εκπαίδευσης και εργασίας.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ψωρίαση .....	7
1.2 Μορφές ψωρίασης.....	7
1.3 Ανοσολογικός μηχανισμός πρόκλησης της ψωρίασης.....	8
1.4 Γενετική βάση της ψωρίασης.....	10
1.5 Φαρμακογενετική της ψωρίασης.....	12
1.6 Απρεμιλάστη .....	13
1.7 Φωσφοδιεστεράση 4.....	15
1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	17
2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	17
2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης .....	19
2.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) .....	21
2.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR για αλληλούχηση .....	23
2.5 Ανάλυση αλληλουχιών.....	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	25
3.1 Αποτελέσματα PCR.....	25
3.2 Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP .....	26
3.3 Αποτελέσματα αλληλούχησης .....	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	30
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μία πολυπαραγοντική νόσος με ισχυρό γενετικό υπόβαθρο. Οι συνήθεις αγωγές στοχεύουν στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και περιλαμβάνουν φάρμακα, όπως τους βιολογικούς παράγοντες (π.χ. αντι-TNF) και τα συστημικά φάρμακα. Ωστόσο, δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς στη θεραπεία. Στόχος της φαρμακογενετικής είναι η ταυτοποίηση παραλλαγών, όπως SNPs του γονιδιώματος που μπορεί να συσχετίζονται με την απόκριση σε θεραπεία. Υπάρχουν περιορισμένες μελέτες φαρμακογενετικής στην ψωρίαση, οι οποίες αφορούν συστημικές θεραπείες όπως η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη και η ακιτρετίνη και ορισμένους βιολογικούς παράγοντες (αντι-TNF και αναστολείς των IL-12/23). Η απρεμιλάστη είναι ένα νέο φάρμακο που χορηγείται από το 2014 σε ασθενείς με ψωρίαση και δεν υπάρχει κάποια δημοσιευμένη σχετική φαρμακογενετική μελέτη. Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί μία προκαταρκτική μελέτη στην οποία θα στηριχθεί φαρμακογενετική ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών με την απόκριση σε αυτό το φάρμακο. Ως υποψήφιο γονίδιο επιλέχθηκε το *PDE4B* (φωσφοδιεστεράση 4), διότι αποτελεί στόχο αυτού του φαρμάκου καθώς η απρεμιλάστη είναι ένας μοριακός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4. Ειδικότερα, η μελέτη περιλαμβάνει γονοτύπηση του SNP *rs6684621* του γονιδίου *PDE4B* σε τριάντα επτά δείγματα ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση και τους χορηγήθηκε η απρεμιλάστη. Με βάση τη γονοτύπηση, η οποία έγινε με PCR-SSCP και ακόλουθη αλληλούχηση επιλεγμένων δειγμάτων, προσδιορίστηκαν οι γονοτυπικές [ $f(CC) = 0.45$ ,  $f(CT) = 0.37$  και  $f(TT) = 0.16$ ] και οι αλληλομορφικές συχνότητες [ $p = f(C) = 0.635$  και  $q = f(T) = 0.345$ ]. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός για να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση απόκρισης στο φάρμακο ωστόσο σε εξέλιξη είναι η συλλογή επιπλέον δειγμάτων, ώστε να πραγματοποιηθεί αξιόπιστη ανάλυση συσχέτισης για αυτό αλλά και για άλλα SNPs τόσο του γονιδίου *PDE4B* όσο και των άλλων τριών γονιδίων της φωσφοδιεστεράσης 4.

## ABSTRACT

Psoriasis is a multifactorial disease with a strong genetic background. Treatments include biological agents (e.g. anti-TNF inhibitors) and systemic drugs. However, not all patients respond to treatment. The aim of pharmacogenetics is to identify polymorphisms (e.g. SNPs) that are associated with response to a drug. There are limited studies of pharmacogenetics in psoriasis, which address systemic therapies such as methotrexate, cyclosporine and acitretin and specific biological agents (anti-TNF and IL-12/23 inhibitors). Apremilast is a new drug that has been approved since 2014 to patients with psoriasis. However, till now there is no published pharmacogenetic study of apremilast. This work is a preliminary study for a pharmacogenetic association analysis of polymorphisms with response to this drug. *PDE4B* gene (phosphodiesterase 4) was selected as a candidate gene because it is the target of this drug. Apremilast is a molecular inhibitor of phosphodiesterase 4. Specifically, the study included genotyping of the SNP *rs6684621* of the *PDE4B* gene in thirty-seven patients with psoriasis

treated with apremilast. Genotyping has been performed with PCR-SSCP and sequencing of selected samples. Based on the genotyping results, genotypic [ $f(CC) = 0.45$ ,  $f(CT) = 0.37$  and  $f(TT) = 0.16$ ] and allelic frequencies [ $p = f(C) = 0.635$  and  $q = f(T) = 0.345$ ] were calculated. The number of samples is small to perform an association analysis of the drug response. However, additional samples are being collected in order to perform a reliable association analysis for this and other SNPs of *PDE4B* as well as the three other phosphodiesterase 4 genes.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πάθηση του δέρματος που επηρεάζει παγκοσμίως το 2-5% του ανθρώπινου πληθυσμού (Dogra et al. 2016). Η συχνότητα στους ενήλικες κυμαίνεται από 0,51 έως 11,43% και σε παιδιά από 0 έως 1,37% ανάλογα με την ηλικία, τη γεωγραφική θέση και την πληθυσμιακή ομάδα (Michalek et al. 2017). Κλινικά, χαρακτηρίζεται από ερυθριματώδεις κηλίδες, βλατίδες και πλάκες, οι οποίες καλύπτονται από αργυρόχρωμα λέπια. Οι ερυθριματώδεις κηλίδες του δέρματος είναι συνέπεια του υπερπολλαπλασιασμού των επιδερμικών κυττάρων με πρόωρη παραγωγή κερατινοκυττάρων και μη ολοκληρωμένη κερατινοποίηση και διατήρηση του πυρήνα στην κεράτινη στιβάδα. Ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης των βασικών κυττάρων αυξάνεται σε αντίθεση με εκείνον του φυσιολογικού δέρματος (Parisi et al. 2013). Η στοιβάδα των βασικών κυττάρων είναι το βαθύτερο στρώμα της επιδερμίδας και περιλαμβάνει τα κερατινοκύτταρα και τα μελανοκύτταρα. Ειδικότερα, τα κύτταρα στη μίτωση έχουν γρηγορότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (50 φορές ταχύτερα) σε σύγκριση με την φυσιολογική επιδερμίδα (Raychaudhuri et al. 2014). Παλαιότερα, η ψωρίαση είχε θεωρηθεί ως μια ασθένεια με υπερπολλαπλασιασμό και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, ενώ οι πρόσφατες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι η ψωρίαση είναι μία αυτοάνοση δερματική πάθηση που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικές αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος ρυθμιζόμενες από τα T-κύτταρα. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης είναι α) παχιά επιδερμίδα η οποία χαρακτηρίζεται από υπερπαραγωγή κερατινοκυττάρων και έκφραση της κερατίνης 16 (K16) σε κύτταρα πάνω από το βασικό στρώμα και β) δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων T κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων και ουδετερόφιλων (Clark et al. 2006).

## 1.2 Μορφές ψωρίασης

Η διάγνωση της ψωρίασης είναι κυρίως κλινική. Υπάρχουν διάφοροι κλινικοί τύποι ψωρίασης. Η πιο συνηθισμένη είναι η χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας, η οποία επηρεάζει το 80% έως το 90% των ασθενών με ψωρίαση. Το χαρακτηριστικό της ψωρίασης κατά πλάκας είναι καλά οριοθετημένες, συμμετρικές ερυθριματώδεις πλάκες που καλύπτονται με αργυρόχρωμη συσσώρευση νεκρών κυττάρων του δέρματος (Εικόνα 1). Αυτές οι πλάκες εμφανίζονται συνήθως στο τριχωτό της κεφαλής, στα γόνατα, στους αγκώνες και στο κάτω μέρος της πλάτης. Λιγότερο κοινές μορφές ψωρίασης είναι η ανάστροφη ψωρίαση, η φλυκταινώδης ψωρίαση, η σταγονοειδής ψωρίαση και η ερυθροδερμική ψωρίαση. Αυτές οι μορφές διαφοροποιούνται μεταξύ τους από τη μορφολογία που έχει ο κάθε τύπος πλάκας (Kim et al. 2017). Στην ανάστροφη ψωρίαση το εξάνθημα εμφανίζεται στις πτυχωτές περιοχές του σώματος (μασχάλες, κάτω από τους μαστούς, ανάμεσα στους γλουτούς, στις μηρογεννητικές πτυχές) και

οι πλάκες αντί να έχουν λέπια είναι υγρές λόγω της ανατομικής τους εντόπισης. Όσον αφορά τη φλυκταινώδη ψωρίαση, η μορφή αυτή θεωρείται ιδιαίτερα σπάνια και στα πλαίσια της κλινικής εικόνας παρατηρούνται φυσαλίδες με πύο. Αρχικά οι φυσαλίδες είναι άσπρες, μετά γίνονται κίτρινες κατόπιν περισσότερο κίτρινες ή καφέ. Υπάρχουν δύο βασικά είδη φλυκταινώδους ψωρίασης, η τοπική που περιορίζεται στα χέρια και τα πόδια και η εκτεταμένη, όπου τα συμπτώματα ψωρίασης εμφανίζονται σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Η σταγονοειδής ψωρίαση χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μικρών, φολιδωτών αλλοιώσεων ροζ ή κόκκινου χρώματος σε σχήμα σταγόνας. Οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζονται σε εκτεταμένες περιοχές του σώματος, όπως ο κορμός, τα άκρα και ορισμένες φορές το τριχωτό της κεφαλής και το πρόσωπο. Τα συμπτώματα ψωρίασης αυτού του τύπου εμφανίζονται συνήθως αιφνιδίως και σε νεότερους ασθενείς, κυρίως μετά από λοίμωξη από στρεπτόκοκκο. Τέλος, η ερυθροδερμική θεωρείται σπάνια μορφή ψωρίασης και οι πλάκες της νόσου καταλαμβάνουν σχεδόν όλη την επιφάνεια του δέρματος, εγκαθίστανται σταδιακά ή και αιφνιδία. Τα λέπια εδώ είναι λιγότερα και το δέρμα είναι έντονα ερυθρό (ερυθροδερμία), γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια περισσότερου νερού και θερμότητας από την επιδερμίδα (Weigle et al. 2013).



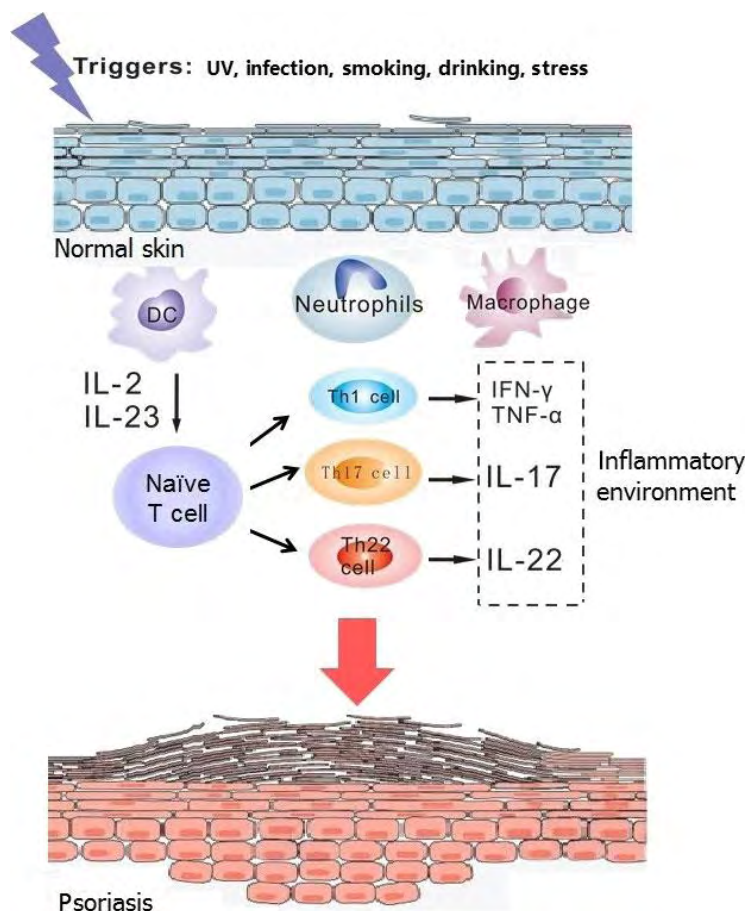
Εικόνα 1: Μορφές της ψωρίασης (National Psoriasis Foundation)

### 1.3 Ανοσολογικός μηχανισμός πρόκλησης της ψωρίασης

Το 1979, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η κυκλοσπορίνη A (CsA) βελτιώνει τις ψωριασικές εκδηλώσεις του δέρματος, γεγονός που φανέρωσε πως η παθολογία της ψωρίασης σχετίζεται όχι μόνο με τα κερατινοκύτταρα αλλά και με το ανοσοποιητικό σύστημα (Meinardi et al. 1987). Τα κύτταρα που είναι σημαντικά στην παθογένεση της ψωρίασης είναι τα δένδριτικά κύτταρα DC, τα βοηθητικά κύτταρα T (Th17 και Th1) και τα κερατινοκύτταρα (Harden et al. 2015), όπως δείχνει και η Εικόνα 2. Τα δένδριτικά κύτταρα DC, τα οποία ενεργοποιούνται από ποικίλλα ερεθίσματα, παράγουν και εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου TNF -α και ιντερλευκίνη IL-23 και IL-2. Η IL-23 επάγει τη διαφοροποίηση των T



κυττάρων σε Th17. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα Th17 υπερπαράγουν IL-17 και IL-22 (Hawkes et al. 2017). Ο παράγοντας TNF-α και η IL-17 ενεργοποιούν τα κερατινοκύτταρα και προάγουν την επιδερμική υπερπλασία. Επίσης, επάγεται η στρατολόγηση κυττάρων που παρατηρούνται κατά τη φλεγμονή, όπως τα ουδετερόφιλα, και η παραγωγή αντιμικροβιακού πεπτιδίου AMP. Η IL-12 που παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα επάγει τα Th1. Τα Th1 παράγουν κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης IFN-γ (Teunissen et al. 1998). Αυτή η ανώμαλη ανοσοαπόκριση συνεχίζεται καθώς ο TNF-α ενεργοποιεί τα δενδριτικά κύτταρα. Έπειτα, αυτές οι κυτταροκίνες αλληλεπιδρούν με τα επιδερμικά και δερματικά κύτταρα και στη συνέχεια προκαλούν αλλαγές, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και την πάχυνση της επιδερμίδας. Όλες οι αλλαγές που αφορούν στα δύο κύρια μονοπάτια των T κυττάρων περιλαμβάνουν: IL-2 / Th1 / ιντερφερόνη IFN-γ και IL-23 / Th17 / IL-17. Στο πρώτο μονοπάτι, η IFN-γ που παράγεται από ενεργοποιημένα κύτταρα Th1 επάγει την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων σε δενδριτικά κύτταρα και την ενδοκυτταρική προσκόλληση του μορίου (ICAM)-1 στα κερατινοκύτταρα, διεγείρει τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)-α από μακροφάγα και αναστέλλει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων (Myers et al. 2006). Στο δεύτερο μονοπάτι, τα κύτταρα Th17 απελευθερώνουν τις κυτταροκίνες IL-17 και IL-22. Η IL-17 μπορεί να επηρεάσει την έκφραση κυτταροκινών όπως TNF-α και ICAM-1, να αυξήσει την έκφραση των κερατινοκυττάρων σε χημειοκίνες και να μειώσει την έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (Fitzgerald et al. 2014). Η IL-22 προωθεί επίσης τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Fujita 2013). Και τα δύο μονοπάτια οδηγούν στη ρήξη του φραγμού του δέρματος.



Εικόνα 2: Παθογένεση της ψωρίασης (Zeng et al. 2017)

## 1.4 Γενετική βάση της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια με ισχυρό γενετικό υπόβαθρο. Η συχνότητα της ψωρίασης είναι σημαντικά αυξημένη ( $P < 0,05$ ) στους συγγενείς των ασθενών και το ποσοστό εμφάνισης (συμπτωτικότητα) είναι πολύ υψηλότερο μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων (65-72%) σε σύγκριση με τα διζυγωτικά δίδυμα (15-30%), γεγονός που έδειξε ότι η γενετική προδιάθεση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ψωρίαση (Lønnberg et al. 2013).

Σχετικά με τους γενετικούς τόπους που συμβάλουν στην εκδήλωση της ψωρίασης, τα πρώτα δεδομένα προέρχονται από μελέτες γενετικής σύνδεσης. Ειδικότερα, φαίνεται ότι ο γενετικός τόπος *PSORS1* αντιπροσωπεύει το 35-40% της κληρονομικότητας της ψωρίασης. Ο *PSORS1* χαρτογραφείται στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) στη χρωμοσωματική περιοχή 6p21. Οι έρευνες καθόρισαν την ελάχιστη κρίσιμη περιοχή μήκους 150 kb που καλύπτει την περιοχή MHC τάξης I και περιλαμβάνει εννέα γονίδια. Από αυτά, τρία (*HLA-C*, *CCHCR1* και *CDSN*) είναι πολύ πολυμορφικά (Puig, et al. 2014). Το *HLA-C* κωδικοποιεί έναν υποδοχέα MHC τάξης I που συμμετέχει σε ανοσοαποκρίσεις μέσω της παρουσίας αντιγόνων

σε Τ λεμφοκύτταρα και γι' αυτό το λόγο αποτελεί πολύ καλό υποψήφιο γονίδιο. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* με την ψωρίαση. Το *HLA-Cw6* μπορεί να έχει υψηλή συγγένεια δέσμευσης για ένα ή περισσότερα αυτοαντιγόνα της ψωρίασης (Chen et al. 2018). Πράγματι, οι ερευνητές έχουν βρει ότι το *HLA-Cw6* μπορεί να παρουσιάσει ένα συγκεκριμένο αυτοαντιγόνο μελανοκυττάρων (ADAMTS-like protein 5) σε Τ κύτταρα (Arakawa et al. 2015). Το ADAMTSL5 είναι μία πρωτεΐνη της υπερικογενείας ADAMTS των μεταλλοπρωτεασών που παίζει ρόλο στο σχηματισμό μικροϊνιδίων και έχει συσχετιστεί με την ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης. Σε ασθενείς με ψωρίαση, τα μελανοκύτταρα τους φάνηκαν να εκφράζουν αυξημένα επίπεδα ADAMTSL5. Η λειτουργία του γονιδίου *CCHCR1* δεν είναι γνωστή, ενώ το *CDSN* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη των κερατινοκυττάρων που εμπλέκεται στην απολέπιση του δέρματος, μια διαδικασία που είναι γνωστό ότι διαταράσσεται στην ψωρίαση.

Η περιοχή *PSORS4* χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1q21, όπου υπάρχει το Σύμπλεγμα Επιδερμικής Διαφοροποίησης (Epidermal Differentiation Cluster EDC). Πρόκειται για ένα εξελικτικά διατηρημένο τμήμα του γονιδιώματος με περισσότερα από 60 γονίδια που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η διαγραφή δύο γονιδίων του EDC (*LCE3B* και *LCE3C*, που κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου) συνδέεται με την εμφάνιση της ψωρίασης. Άρα έχουν παθογόνο ρόλο και προκαλούν διάσπαση του επιδερμικού φραγμού (Deng et al. 2016).

Πιο πρόσφατα, σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών SNPs με την ψωρίαση προέκυψαν από μελέτες GWAS (genome wide association studies). Ειδικότερα εντοπίστηκαν 47 SNPs, σημαντικό ποσοστό των οποίων βρίσκονται σε γονίδια που συμμετέχουν σε συγκεκριμένα βιολογικά μονοπάτια του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτά αφορούν την παρουσίαση αντιγόνων (*HLA-C* και *ERAP1*) και κυρίως την ενεργοποίηση των κυττάρων Th17 (Tsoi et al. 2015). Σε μελέτη που περιελάμβανε 761 Ευρωπαίους εντοπίστηκαν 4 SNPs, τα rs27524, rs26653, rs30187, rs151823 στο *ERAP1*. Επίσης, μία μελέτη σε 653 Κινέζους συσχέτισε 1 SNP του γονιδίου *PTTG1*, το rs2431697, με την ψωρίαση. Ο μεταγραφικός παράγοντας που κωδικοποιείται από το *PTTG1* ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η υπερέκφραση του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα τον υπερπολλαπλασιασμό και μειωμένη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και την υπερπαραγωγή του TNF-α.

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι πυροδοτούν την εμφάνιση των φλεγμονωδών ασθενειών σε άτομα με γενετική προδιάθεση, όπως και στην ψωρίαση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων συμβάλλει στην εμφάνιση, την ανάπτυξη και τα κλινικά συμπτώματα της (Parisi et al. 2013). Πολλές αλλαγές θα μπορούσαν να προκληθούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή, οι μικροβιακές λοιμώξεις (από βακτήρια, μύκητες και ιούς), οι χημικές ερεθιστικές ουσίες, η έκθεση σε ακτινοβολία UV, το κάπνισμα και το αλκοόλ (Meglio et al. 2014).

## 1.5 Φαρμακογενετική της ψωρίασης

Ο κλάδος της φαρμακογενετικής μελετά πώς το γενετικό υπόβαθρο επηρεάζει την απόκριση του οργανισμού σε συγκεκριμένο φάρμακο. Για τη θεραπεία της ψωρίασης χρησιμοποιούνται φάρμακα που στοχεύουν στον έλεγχο των συμπτωμάτων. Ειδικότερα, τα συστημικά φάρμακα εφαρμόζονται στους ασθενείς με ψωρίαση στους οποίους οι τοπικές θεραπείες και η φωτοθεραπεία δεν έχουν κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Τα συστημικά φάρμακα περιλαμβάνουν τις μη βιολογικές θεραπείες, και τους βιολογικούς παράγοντες. Στους μη βιολογικούς παράγοντες ανήκουν η μεθοτρεξάτη που είναι ανταγωνιστής του φολικού οξέος, η κυκλοσπορίνη A, που είναι καταστολέας T-λεμφοκυττάρων και η ακιτρετίνη που είναι ρετινοειδές. Παρόλο που τα φάρμακα είναι πολύ αποτελεσματικά, υπάρχουν πάσχοντες που δεν έχουν θετική απόκριση (Prieto-Pérez et al. 2013). Για αυτό, εγκρίθηκε η χρήση πολυάριθμων βιολογικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνονται οι αναστολείς του TNF- $\alpha$ , όπως οι infliximab και etanercept, οι αναστολείς των IL-12/23, όπως ο ustekinumab, οι αναστολείς της IL-17, όπως οι brodalumab και secukinumab και οι αναστολείς της IL-23, όπως ο tildrakizumab. Ωστόσο, δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς με τον ίδιο τρόπο στη θεραπεία. Στόχος των φαρμακογενετικών μελετών είναι η εκ των προτέρων αντιστοίχιση της θεραπείας με το συγκεκριμένο ασθενή. Αυτός είναι και ο σκοπός της εξατομικευμένης θεραπείας (Hwang et al. 2017).

Όσον αφορά τις φαρμακογενετικές μελέτες των συστημικών θεραπειών, σε μία μελέτη που αφορά την απόκριση στην μεθοτρεξάτη διερευνήθηκε εάν SNPs σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς μεθοτρεξάτης και σε υποδοχείς αδενοσίνης σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα ή/και με την τοξικότητα του φαρμάκου. Το δείγμα περιελάμβανε 374 ασθενείς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας, που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με μεθοτρεξάτη για τουλάχιστον 3 μήνες. Τα αποτελέσματα ήταν πως τρία SNPs του μεταφορέα εκροής *ABCC1* τα rs35592 (p-value= 0,008), rs2238476 (p-value= 0,02) και rs28364006 (p-value=0,02) συσχετίστηκαν με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Ακόμη, τέσσερα SNPs του ίδιου γονιδίου, τα rs11075291 (p-value=0,008), rs1967120 (p-value=0,01), rs3784862 (p-value=0,002), rs246240 (p-value=0,0006) συσχετίστηκαν με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών και τοξικότητας. Τέλος, δύο SNPs του μεταφορέα εκροής *ABCG2*, τα rs13120400 (p-value=0,03) και rs17731538 (p-value=0,007) συσχετίστηκαν με την αποτελεσματικότητα στη μεθοτρεξάτη (Warren et al. 2008).

Σε μία άλλη φαρμακογενετική μελέτη σε 84 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν κυκλοσπορίνη A, ταυτοποιήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του SNP 3435T του *ABCB1* με αρνητική απόκριση στη θεραπεία (Vasilopoulos et al. 2014).

Επιπρόσθετα, μία άλλη φαρμακογενετική μελέτη περιλαμβάνει 124 ασθενείς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας οι οποίοι είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με ακιτρετίνη για τουλάχιστον 3 μήνες. Ειδικότερα, ο πολυμορφισμός -460 του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF συσχετίστηκε με την απόκριση στη θεραπεία με ακιτρετίνη (P=0,01). (Young et al. 2006).

Όσον αφορά τους βιολογικούς παράγοντες, μία έρευνα σε ισπανικό πληθυσμό 116 ατόμων έδειξε ότι η παρουσία των αλληλομόρφων HLA-C:06:02 και LCE-I (ID/II) του γονιδίου του επιδερμικού φραγμού LCE (late-cornified envelope) συσχετίζεται με θετική απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF. Επιπλέον, μία έρευνα στον ελληνικό πληθυσμό με 250 άτομα συμπέρανε πως ο πολυμορφισμός rs1048554, που βρίσκεται κοντά στον γενετικό τόπο HLA-C, συσχετίζεται με καλύτερη απόκριση των ασθενών στα φάρμακα αντι-TNF. Ακόμη, οι ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο A (rs610604) του HLA-C, αποκρίθηκαν καλύτερα στην αδαλιμουμάμπη (Tutuncu et al. 2005).

Ο πολυμορφισμός rs1799964 που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου *TNF* συσχετίστηκε με απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF. Ειδικότερα, μία έρευνα σε 109 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία για 6 μήνες έδειξε πως όσοι φέρουν το γονότυπο TT του rs1799964 ήταν πιθανότερο να ανταποκρίνονται σε φάρμακα αντι-TNF. Ακόμη, οι φορείς του γονότυπου TT έδειξαν καλύτερη απόκριση στην ινφλιξιμάμπη. Ένας άλλος πολυμορφισμός του *TNF*, ο rs361525 που χαρτογραφείται στη θέση -238, συσχετίστηκε με θετική απόκριση. Έτσι, τα άτομα με γονότυπο GG στο rs361525 ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στην ετανερσέπτη και την ινφλιξιμάμπη (Garc et al. 2013).

## 1.6 Απρεμιλάστη

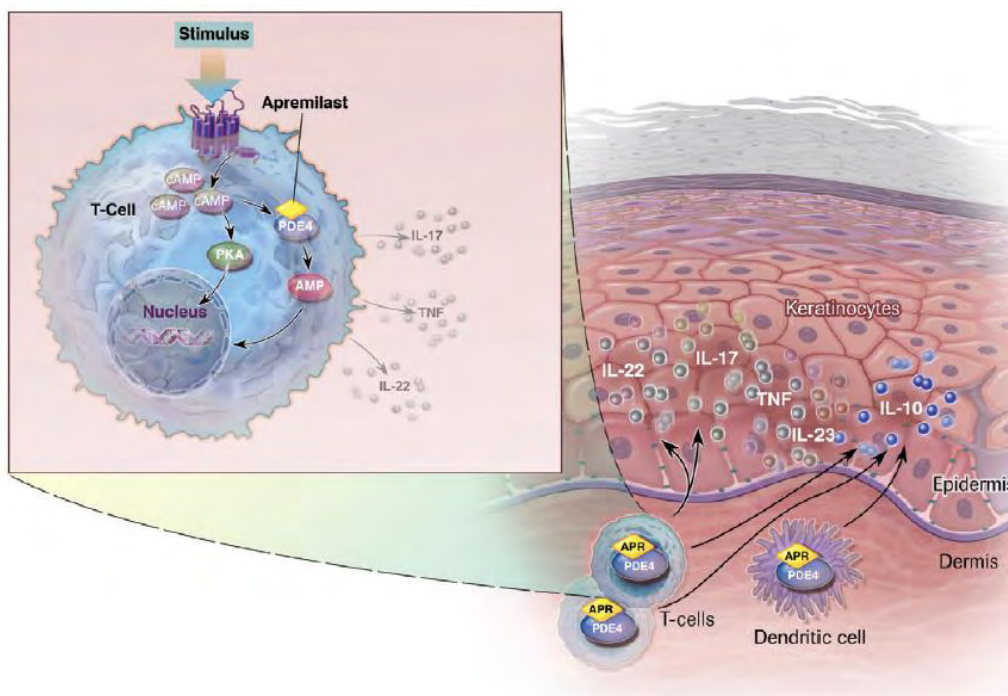
Η απρεμιλάστη είναι ένας μικρός μοριακός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4), η οποία είναι ειδική για την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP). Τον Μάρτιο του 2014, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. ενέκρινε την απρεμιλάστη (Otezla, Celgene Corporation), τον πρώτο ειδικό αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4), για χρήση από ενήλικες με ενεργό PsA (Ψωριασική Αρθρίτιδα). Στη συνέχεια, η απρεμιλάστη έλαβε την έγκριση του FDA το Σεπτέμβριο του 2014 για την περαιτέρω διάθεση του φαρμάκου στην αγορά για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας (Fala 2015).

Η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) είναι ο ρυθμιστής “κλειδί” της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης. Η αναστολή της PDE4 οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP. Σε πρόσφατα πειράματα, αποδείχθηκε ότι οι ισομορφές της PDE4 εκφράζονται σε υψηλότερο βαθμό στο ψωριασικό δέρμα απ’ ό,τι στο φυσιολογικό δέρμα. Στο ψωριασικό δέρμα τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στο ενδοθήλιο (PDE4A και PDE4D) και στους ινοβλάστες (PDE4A, PDE4B και PDE4D). Η έκφραση της PDE4B ήταν εμφανώς υψηλότερη στα αγγεία του επιφανειακού δέρματος των ασθενών με ψωρίαση σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, καθώς και σε φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία ήταν πιο άφθονα στην ψωριασική επιδερμίδα (Peter H. Schafer et al. 2016).

Τα T κύτταρα είναι κεντρικοί μεσολαβητές της συστημικής και τοπικής φλεγμονής στην ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα (Cai et al. 2012). Οι ερευνητές παρατήρησαν πως η

απρεμιλάστη σε καλλιέργειες T-κυττάρων ανέστειλε τις κυτταροκίνες Th1, Th2, Th17 σε διαφορετικό βαθμό. Η απρεμιλάστη ανέστειλε ισχυρότερα την IL-17, η οποία παράγεται από τα κύτταρα Th17 (Tabarkiewicz et al. 2015). Επιπλέον, ανέστειλε τα κύτταρα Th2 και τις κυτταροκίνες IL-5, IL-10 και IL-13 και σε μικρότερο βαθμό τα κύτταρα Th1 και την ιντερφερόνη-γ (P H Schafer et al. 2014). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παραγωγή IL-17 από τα T-λεμφοκύτταρα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ενζυμική δραστηριότητα της PDE4 και είναι πολύ ευαίσθητη στην αναστολή της PDE4 από την απρεμιλάστη.

Ένας λειτουργικός ρόλος για την PDE4 έχει επίσης παρατηρηθεί στα κερατινοκύτταρα. Πρώτον, όλες οι ισομορφές της PDE4 εκφράζονται στους πληθυσμούς των κερατινοκυττάρων. Η απρεμιλάστη αποτρέπει την αποικοδόμηση του cAMP (Peter H. Schafer et al. 2016) και ελαττώνει την παραγωγή των IL-17 και IL-22 (Εικόνα 3). Από την άλλη πλευρά, τα φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του TNF-α και διατηρούν σταθερό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι επιστήμονες έδειξαν ότι η απρεμιλάστη ρυθμίζει την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων σε φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα τα οποία είχαν διεγερθεί από την IL-17. Ειδικότερα μειώθηκε η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτταροκίνες IL-12 / IL-23, IL-19, IL-31 και IL -33 (Pincelli et al. 2018).



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης, IL: ιντερλευκίνη, PDE4: φωσφοδιεστεράση 4, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκου (Pincelli et al. 2018)

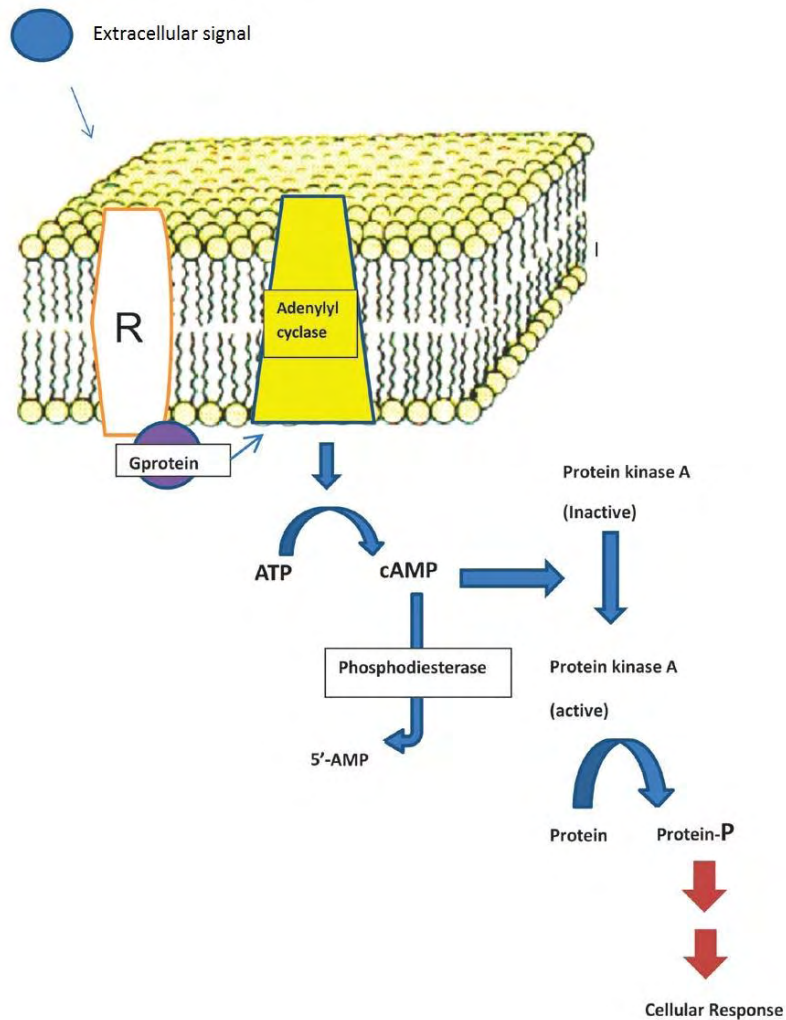
## 1.7 Φωσφοδιεστεράση 4

Η φωσφοδιεστεράση 4 (PDE4) εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων ιδιαίτερα σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δηλαδή, δένδριτικά κύτταρα, T κύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα (Wcisło-Dziadecka et al. 2017).. Η PDE4 έχει τέσσερις ισομορφές (A, B, C, D), είναι το πρωτογενές ένζυμο μεταβολισμού του cAMP και εμπλέκεται στον έλεγχο της απόκρισης σε φλεγμονώδη κύτταρα (Spadaccini et al. 2017).

Ο μηχανισμός δράσης της φωσφοδιεστεράσης 4 φαίνεται στην Εικόνα 4. Στο πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης της οδού του cAMP, το εξωκυτταρικό σήμα συνδέεται με τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Μετά τη σύνδεση, το εξωκυτταρικό σήμα μεταφέρεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό τμήμα του υποδοχέα, το οποίο αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες G, έτσι ώστε όταν το σήμα δεσμευθεί στον υποδοχέα, η πρωτεΐνη G ενεργοποιείται. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη G αλληλεπιδρά με την αδενυλική κυκλάση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τελευταίας. Η αδενυλική κυκλάση, στη συνέχεια, παράγει cAMP από ATP. Ακολούθως, το cAMP μετατρέπει την πρωτεϊνική κινάση A από την ανενεργή της μορφή στην ενεργό μορφή της. Πλέον, η πρωτεϊνική κινάση A μπορεί να ενεργοποιήσει πρωτεΐνες-κλειδιά εντός του πυρήνα για να ξεκινήσει ή να μεταβάλλει την κυτταρική απόκριση. Το cAMP αποικοδομείται γρήγορα και απενεργοποιείται μέσω της δράσης της φωσφοδιεστεράσης (Moustafa et al. 2014).

Αυξημένα επίπεδα cAMP αναστέλλουν την οδό του NF-kB με αποτέλεσμα τη μείωση του TNF. Επίσης, αυξημένα επίπεδα cAMP σε λευκοκύτταρα καταστέλλουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α, IL-12) και του προ-φλεγμονώδους μεσολαβητή λευκοτριενίου B4. Ταυτόχρονα, το cAMP ενισχύει την παραγωγή της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10. Το cAMP διασπάται στην ενεργό του μορφή από τη φωσφοδιεστεράση 4. Επομένως, η ισορροπία του cAMP ενδο-κυτταρικά ρυθμίζεται ή διατηρείται μέσω των επιδράσεων των υποδοχέων GPCRs, οι οποίοι αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP και των φωσφοδιεστερασών, οι οποίες μειώνουν την ενδοκυτταρική ποσότητα cAMP (Serezani et al. 2008).

Με βάση την παρουσία και τον ρόλο της PDE4 σε διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα, οι αναστολείς PDE4 μπορούν να ασκήσουν αντιφλεγμονώδη δράση σε όλα σχεδόν τα φλεγμονώδη κύτταρα και να εξυπηρετήσουν έναν πιθανό ρόλο ως αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Wittmann et al. 2013).



Εικόνα 4: Μονοπάτι του cAMP (Moustafa et al. 2014)

## 1.8 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Με βάση το ρόλο της φωσφοδιεστεράσης 4 στον έλεγχο της απόκρισης σε φλεγμονώδη κύτταρα, σκοπός είναι ο έλεγχος συσχέτισης πολυμορφισμών στην *PDE4* με την απόκριση στην θεραπεία με απρεμιλάστη σε ασθενείς με ψωρίαση. Ειδικότερα, στην παρούσα πτυχιακή εργασία, σκοπός ήταν ο έλεγχος του πολυμορφισμού (SNP) rs6684621 στο γονίδιο *PDE4B*, καθώς αποτελεί στόχο της απρεμιλάστης.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) είναι μια ενζυμική δοκιμασία που επιτρέπει την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Ο Kary Mullis, ο οποίος επινόησε τη διαδικασία, εξήγησε ότι "σας επιτρέπει να επιλέξετε το κομμάτι του DNA που σας ενδιαφέρει και να έχετε όση ποσότητα επιθυμείτε" (Mullis et al. 1987). Για τη διαδικασία της PCR απαιτούνται ελάχιστες ποσότητες DNA και παράγονται αρκετά αντίγραφα για περαιτέρω ανάλυση (Garibyan et al. 2013).

Κάθε PCR απαιτεί την παρουσία εκμαγείου DNA, εκκινητών, νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση είναι το βασικό ένζυμο που συνδέει μεμονωμένα νουκλεοτίδια για να σχηματίσει το προϊόν. Οι εκκινητές στην αντίδραση οριοθετούν το ακριβές προϊόν που πρόκειται να ενισχυθεί και είναι ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά του DNA-στόχου. Αυτοί χρησιμεύουν ως σημείο επέκτασης για να ξεκινήσει να προσθέτει νουκλεοτίδια η DNA πολυμεράση (Caetano-Anollés 2013). Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή ο οποίος πραγματοποιεί επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης DNA. Ο θερμοκυκλοποιητής αυξομειώνει τη θερμοκρασία του με ακριβή και προγραμματισμένα βήματα. Το διάλυμα αντίδρασης αρχικά θερμαίνεται ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του εκμαγείου, όπως δείχνει η Εικόνα 5. Η θερμοκρασία στη συνέχεια μειώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να δεσμευτούν στα τμήματα του DNA στόχου, μια διαδικασία γνωστή ως υβριδοποίηση των εκκινητών. Η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι, οπότε η DNA πολυμεράση είναι ικανή να επεκτείνει τους εκκινητές προσθέτοντας νουκλεοτίδια στην αναπτυσσόμενο κλώνο DNA, μια διαδικασία γνωστή ως επιμήκυνση της αλυσίδας ή πολυμερισμός. Με κάθε επανάληψη αυτών των τριών βημάτων, ο αριθμός των μορίων DNA αυξάνεται εκθετικά (Garafutdinov et al. 2017).

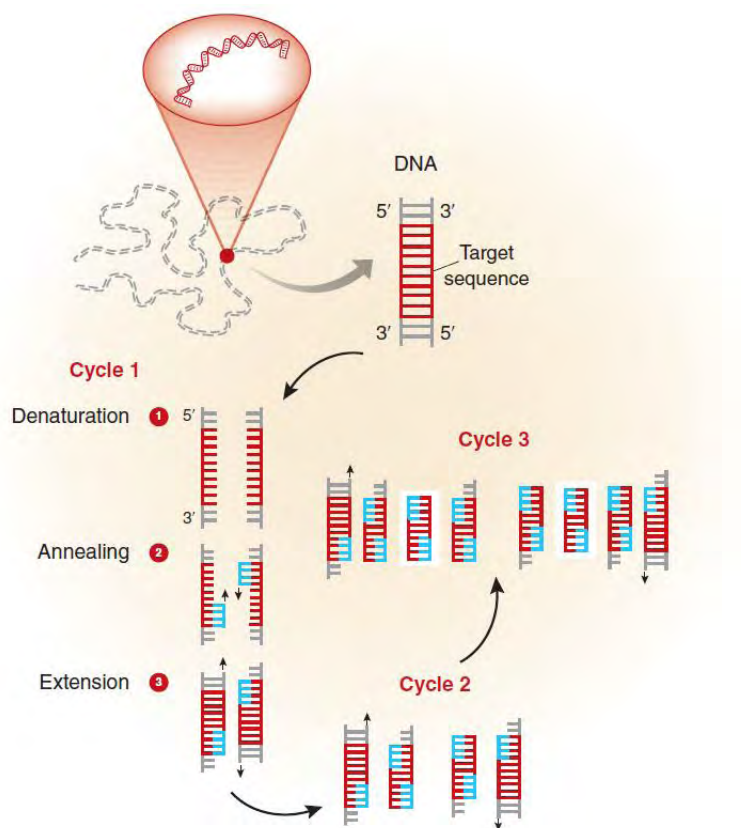
Η μέθοδος της PCR πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ενίσχυση τμήματος DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό (SNP) rs6684621 εντός του γονιδίου *PDE4B*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Εμπρόσθιος: 5' CCT GAG GGA ATG CCA AGG GA 3'

Ανάστροδος: 5' ATC CAA TTT GCA ATA ACT GGC TGT 3'

Η αλληλουχία στόχος είναι η ακόλουθη. Με κίτρινο χρώμα φαίνεται το SNP rs6684621 και με κόκκινο χρώμα οι εκκινητές. Το αναμενόμενο προϊόν της PCR έχει μέγεθος 264 bp.

gccagtggcactccactgcaaaacta**cctgaggggaatgccaaagga**agctggccatgaga  
 acatgtcatatacttttagatactgggcactgcagaaaaagaaaaaacaacaacacaa  
 ctgtgtgcattttgagagcctgatgcaagaaacatac**c**agaaccagaacaagaacgcccc  
 ttttctctattgtctttttggaaccctctgttacaaaggggttgtagacacctggcaaagaa  
 taaatataggattcagttcgattatt**acagccagttattgcaaattggat**atggaactaa



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της PCR (Garibyan et al. 2013)

Τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής:

1. Ξεπάγωμα όλων των αντιδραστηρίων και ανάδευσή τους
2. Για την παρασκευή του Master Mix προστίθενται και αναδεύονται σε ένα σωληνάριο τα αντιδραστήρια που υποδεικνύει ο Πίνακας 1, πλην του DNA.
3. Προστίθενται και αναδεύονται σε κάθε σωληνάριο το Master Mix και το DNA του δείγματος.
4. Τα δείγματα εισάγονται στον θερμοκυκλοποιητή όπου εφαρμόζεται το εξής πρόγραμμα ενίσχυσης τους για τριάντα πέντε κύκλους

- 95 °C για 5 min
- 95 °C για 40 sec
- 60 °C για 40 sec
- 72 °C για 40 sec
- 72 °C για 10 min

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια της PCR

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα (μl)</b>
DNA εκμαγείο	1.5*
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	0.5
Ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	0.5
dNTPs (10mM)	1
DNA Πολυμεράση Kapa Taq (5units/μl)	0.2
ddH <sub>2</sub> O	41.3
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50

\*Η ποσότητα DNA που προστίθεται εξαρτάται από την επιλογή του δείγματος (100-300ng).

## 2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό θραυσμάτων DNA (ή άλλων μακρομορίων, όπως RNA και πρωτεϊνών) με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη διέλευση ρεύματος διαμέσου της πηκτής, όπου περιέχονται τα μόρια που μελετούνται. Με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, τα μόρια θα μετακινηθούν μέσω της πηκτής σε διαφορετικές κατευθύνσεις ή με διαφορετικές ταχύτητες, επιτρέποντάς τους να διαχωριστούν το ένα από το άλλο (Stellwagen 2010).

Όλα τα μόρια DNA έχουν την ίδια ποσότητα φορτίου ανά μάζα. Οπότε, στην ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA ο διαχωρισμός βασίζεται μόνο στο μέγεθος, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί με παράλληλη ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA γνωστών μεγεθών (Lee et al. 2012). Η πηκτή για το διαχωρισμό του DNA παρασκευάζεται από αγαρόζη και κατάλληλο

ρυθμιστικό διάλυμα Τα μόρια αγαρόζης σχηματίζουν μικροσκοπικούς πόρους από τους οποίους διέρχεται το DNA (Wawer et al. 1995).

Τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής:

1. Προσθήκη σε μία κωνική φιάλη TAE 1x και αγαρόζη, όπως υποδεικνύει ο Πίνακας 2, και μεταφορά της στο φούρνο μικροκυμάτων ώστε να λιώσει η αγαρόζη
2. Τα τοιχώματα της κωνικής φιάλης τοποθετούνται κάτω από τρεχούμενο νερό για 30 δευτερόλεπτα υπό συνεχή ανάδευση
3. Προσθήκη 4μl Xpert green χρωστικής στο διάλυμα και απόχυσή του στο ειδικό καλούπι με τα "χτενάκια"
4. Αναμονή για 30 min ώστε να σχηματιστεί η πηκτή
5. Μεταφορά στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x
6. Προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση: Ανάμειξη 6 μl PCR προϊόντος με 4 μl διαλύματος φόρτωσης
7. Τοποθέτηση δείγματος προϊόντος PCR σε κάθε "πηγαδάκι" της πηκτής
8. Εφαρμόζεται τάση ηλεκτρικού πεδίου στα 150 V για 20-30 min
9. Παρατήρηση και φωτογράφιση των ζωνών DNA σε συσκευή UV

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE Buffer (200mM Tris, 200mM CH <sub>3</sub> COOH, 1mM EDTA) σε συγκέντρωση 1x	50 ml
Αγαρόζη	1 gr
Χρωστική Xpert Green DNA	4 μl
Διάλυμα φόρτωσης: Bromophenol Blue 0,25%, Xylene Cyanol 0,25%, Γλυκερόλη 30%, σε dH <sub>2</sub> O.	

## **2.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)**

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism SSCP) είναι μία τεχνική που εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεταλλάξεων, στη συγκεκριμένη πτυχιακή στα προϊόντα της PCR. Το προϊόν PCR υφίσταται αποδιάταξη σε μονόκλωνα μόρια με έκθεση σε αποδιατακτικό διάλυμα και θέρμανση. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (Orita et al. 1989). Εάν υπάρχει μετάλλαξη στο τμήμα DNA που μελετάται θα επηρεαστούν τόσο ο τρόπος αναδίπλωσης της μονόκλωνης αλυσίδας όσο και η κινητικότητά της υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (Hayashi 1992). Ως αποτέλεσμα, οι αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες αλληλουχίες θα μετακινηθούν διαφορετικά στην πηκτή. Η ανάλυση PCR-SSCP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ανίχνευσης για σημειακές μεταλλάξεις. Ωστόσο, δε μπορεί να ανιχνεύσει την ακριβή αλλαγή των νουκλεοτιδίων. Αυτό απαιτεί την αλληλούχηση του DNA (Sekiya 1996).

### **ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ**

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 12%. Για την παρασκευή της εφαρμόστηκαν τα εξής βήματα:

1. Συναρμολόγηση της ειδικής συσκευής
2. Προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως τα αντιδραστήρια που υποδεικνύει ο Πίνακας 3, πλην του TEMED, APS και αναδεύονται μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα
3. Το διάλυμα διηθείται σε έναν ογκομετρικό σωλήνα, ρυθμίζεται έως τα 62,5 ml και μεταφέρεται σε κωνική φιάλη
4. Προστίθενται TEMED και APS στις ποσότητες που υποδεικνύει ο Πίνακας 3 και ακολουθεί σύντομη ανάδευση
5. Αποχύνεται το διάλυμα ανάμεσα στα τζάμια της ειδικής συσκευής όπου θα πολυμεριστεί η πολυακρυλαμίδα
6. Τοποθετούνται τα "χτενάκια" για να σχηματιστούν τα "πηγαδάκια"
7. Αναμονή για ~30 min να σχηματιστεί η πηκτή πολυακρυλαμίδης
8. Αφαιρούνται τα "χτενάκια" και το καλούπι μεταφέρεται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης
9. Προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x στην συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης 12 %

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα</b>
Ακρυλαμίδα	7,5 gr
Δισακρυλαμίδα	0,19 gr
Γλυκερόλη 50%	6,25 ml
TBE 10x	3,2 ml
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	62,5 $\mu$ l
APS 20% (Ammonium Persulfate)	375 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	53 ml

## **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR**

Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των προϊόντων PCR έχει την ακόλουθη σύσταση:

- 95% φορμαμίδιο
- 0,05% μπλε βρωμοφαινόλης
- 0,05% μπλε ξυλενίου
- 10mM υδροξείδιο του νατρίου NaOH

Τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής:

1. Ξεπάγωμα των προϊόντων PCR
2. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 10  $\mu$ l αποδιατακτικό διάλυμα και 7  $\mu$ l προϊόντος PCR.
3. Ακολουθεί αποδιάταξη των προϊόντων PCR με θέρμανση στους
  - 99 °C για 10 min
4. Τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως σε πάγο και "φορτώνονται" στα "πηγαδάκια" της πηκτής πολυακρυλαμίδης και εφαρμόζεται τάση 230 V για 20 ώρες

## **ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ**

Τα βήματα που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής:

1. Τοποθέτηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης σε διαφανή μεμβράνη και μεταφορά της σε σκεύος ανάδευσης
2. Τοποθέτηση του σκεύους σε αναδευτήρα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας της χρώσης
3. Προστίθενται 200 ml από το διάλυμα 1, που υποδεικνύει ο Πίνακας 4, στο σκεύος με την πηκτή πολυακρυλαμίδης
4. Αναδεύεται για 3 min και αποχύνεται το διάλυμα
5. Προστίθενται τα υπόλοιπα 200 ml από το διάλυμα 1 και αναδεύεται για 3 min
6. Αποχύνεται το διάλυμα και προστίθενται το διάλυμα 2, που υποδεικνύει ο Πίνακας 4
7. Αναδεύεται για 8 min και αποχύνεται το διάλυμα
8. Ακολουθούν 2 γρήγορες πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O
9. Προστίθενται το διάλυμα 3, που υποδεικνύει ο Πίνακας 4 και αναδεύεται μέχρι να βαφεί η πηκτή πολυακρυλαμίδης
10. Γρήγορη πλύση με ddH<sub>2</sub>O

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια για τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Διάλυμα 1	Διάλυμα 2	Διάλυμα 3
400 ml ddH <sub>2</sub> O	200 ml ddH <sub>2</sub> O	200 ml ddH <sub>2</sub> O
0,5 ml οξικό οξύ	0,2 gr νιτρικό άργυρο (AgNO <sub>3</sub> )	3 gr υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
		0,02 gr NaBH <sub>4</sub>
		1 ml φορμαλδεΰδη

## **2.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR για αλληλούχηση**

Για τον καθαρισμό των δειγμάτων που προορίζονται για αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit SureClean Plus της εταιρείας BIOLINE. Όπως αναφέρει το πρωτόκολλο, απομακρύνει πρωτεΐνες, όπως περιοριστικά ένζυμα και πολυμεράσες. Επίσης, αφαιρεί από τα δείγματα τα διμερή των εκκινητών και τα dNTPs.

## 2.5 Ανάλυση αλληλουχιών

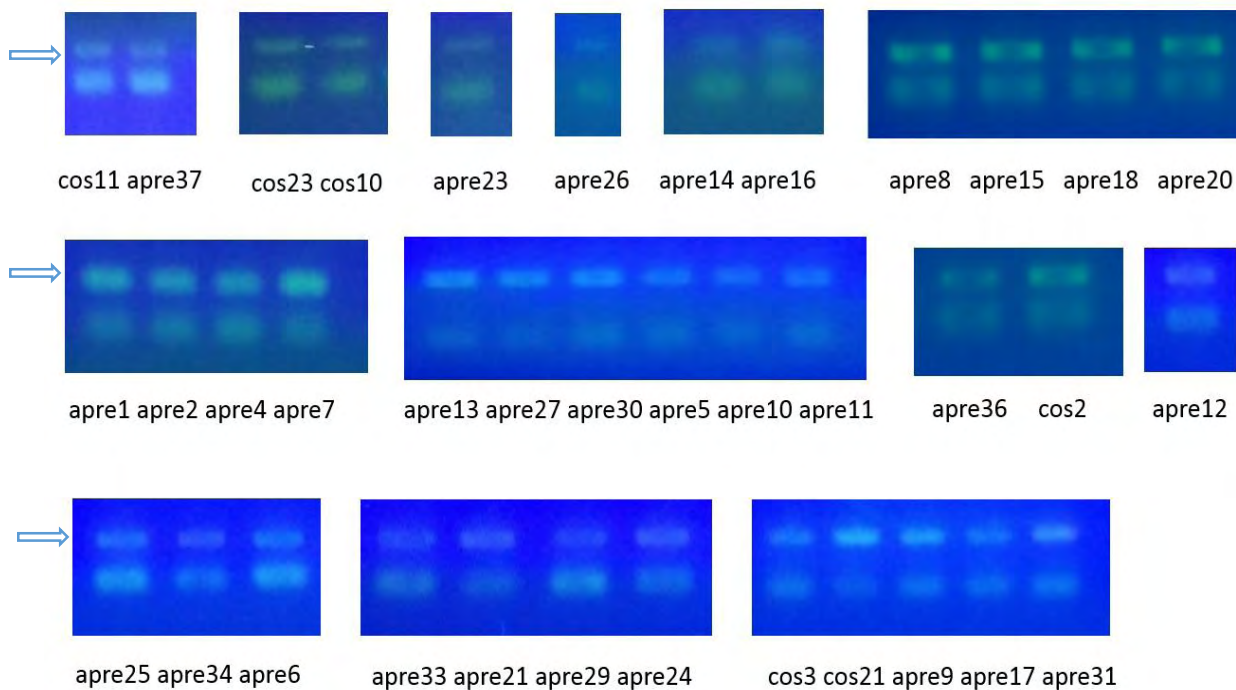
Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA (<https://cemia.eu/>). Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος BioEdit Sequence Alignment Editor. Το πρόγραμμα Bioedit συμβάλλει στον εντοπισμό των πολυμορφισμών, καθώς στοιχίζει τις αλληλουχίες των δειγμάτων που αναλύθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς και έτσι μπορεί να αξιολογηθεί σε ποιες αλληλουχίες υπάρχει κάποια παραλλαγή. Επίσης, όταν το άτομο είναι ετερόζυγο εμφανίζει δύο κορυφές στον πολυμορφισμό, ενώ όταν το άτομο είναι ομόζυγο εμφανίζει μία κορυφή.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Αποτελέσματα PCR

Η PCR εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα με σκοπό την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA που περιέχει το SNP rs6684621 που μελετάται. Για να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η Εικόνα 6 περιέχει τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης όλων των δειγμάτων που ενισχύθηκαν με PCR.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης όλων των δειγμάτων. Με βέλος υποδεικνύεται το επιθυμητό προϊόν της PCR.

### 3.2 Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ομαδοποίηση των δειγμάτων, δηλαδή την κατάταξη τους σε διαφορετικά πρότυπα. Σκοπός της μεθόδου είναι η μείωση του αριθμού των δειγμάτων που θα σταλούν για αλληλούχηση. Ειδικότερα, αλληλουχείται ένα δείγμα από κάθε διαφορετικό πρότυπο. Παρατηρώντας την Εικόνα 7, προέκυψαν 11 διαφορετικά πρότυπα με την εξής ομαδοποίηση των δειγμάτων:

Πρότυπο 1: apre14, apre23, apre24, apre29

Πρότυπο 2: apre26, apre36, cos2, cos11

Πρότυπο 3: apre5, apre6

Πρότυπο 4: apre27

Πρότυπο 5: apre8, apre15, apre18, apre20

Πρότυπο 6: apre1, apre2, apre4, apre7, apre10, apre11, apre13, apre16, apre21, apre30

Πρότυπο 7: apre37

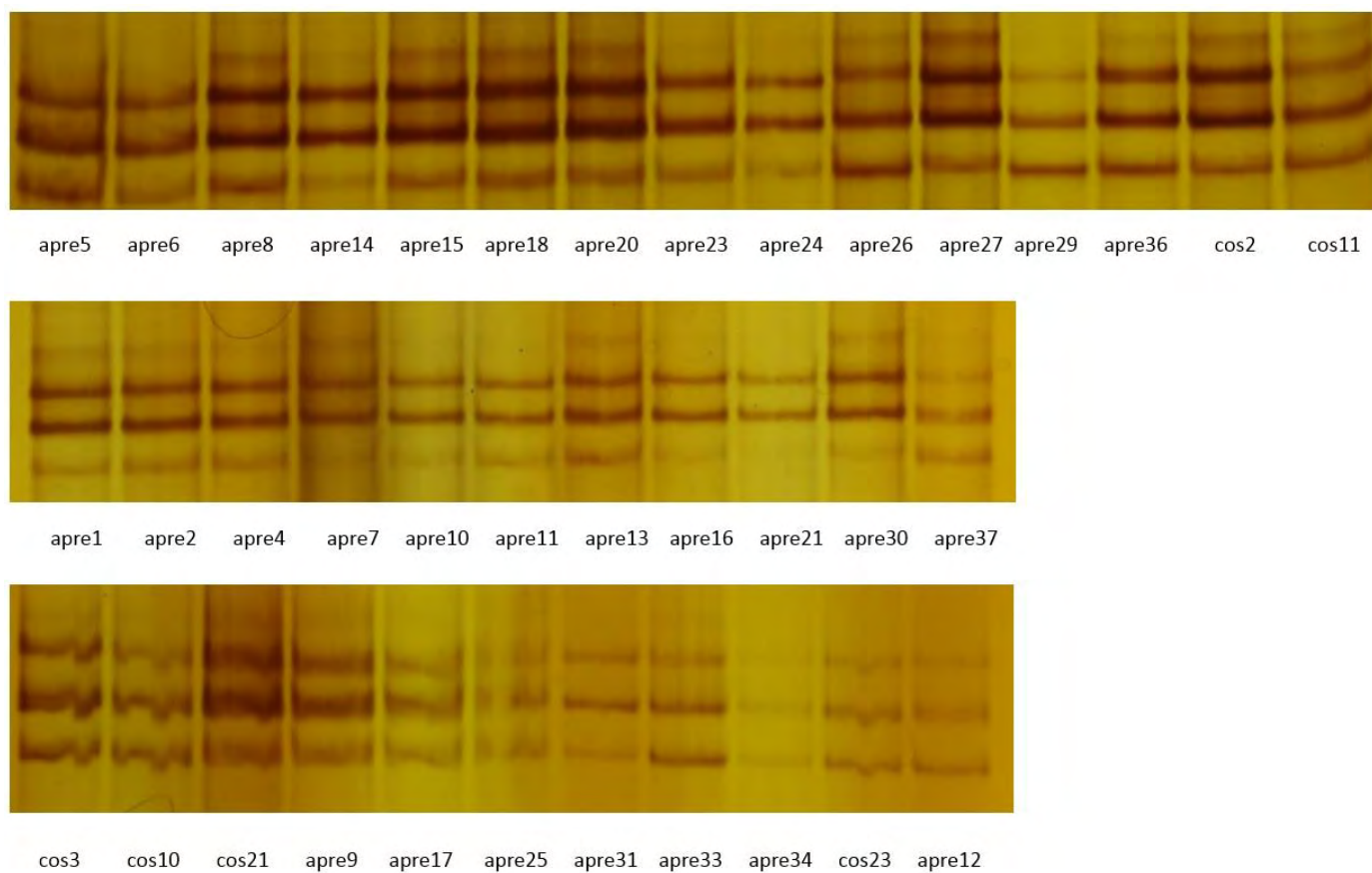
Πρότυπο 8: apre33

Πρότυπο 9: cos3, cos10, cos21, apre9, apre17

Πρότυπο 10: apre31, apre34, apre12, cos23

Πρότυπο 11: apre25

Παρατηρούμε πως τα πρότυπα που προέκυψαν είναι έντεκα που είναι αρκετά σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων που είναι τριάντα επτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως αν συγκρίνουμε τις αντίστοιχες ζώνες των πηκτών πολυακρυλαμίδης δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στα ύψη που εντοπίζονται και είναι δύσκολη η κατηγοριοποίηση τους. Οπότε, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση σε έντεκα πρότυπα για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 7: Αποτελέσματα της SSCP, όπου προέκυψαν έντεκα διαφορετικά πρότυπα

### 3.3 Αποτελέσματα αλληλούχησης

Για αλληλούχηση επιλέχθηκαν τα δείγματα cos3, apre25, apre33, apre31, apre37, apre16, apre6, apre15, apre29, apre27 και cos2. Οι γονότυποι των δειγμάτων συγκεντρώνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Γονότυποι των δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν

Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος
cos3	C/C
apre25	T/T
apre33	C/T
apre31	C/T
apre37	C/T
apre16	C/C
apre6	C/C
apre15	T/T
apre29	C/T
apre27	T/T
cos2	C/T

Έπειτα, σύμφωνα με τα διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν από την SSCP (βλ. Αποτελέσματα 3.2) προσδιορίστηκαν οι γονότυποι όλων των ατόμων (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Γονότυποι των ασθενών με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με απρεμιλάστη

Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος	Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος
cos3	C/C	apre13	C/C
cos10	C/C	apre34	C/T
cos21	C/C	apre21	C/C
apre9	C/C	apre30	C/C
apre17	C/C	apre6	C/C
apre25	T/T	apre5	C/C
apre33	C/T	apre15	T/T
apre31	C/T	apre8	T/T
apre12	C/T	apre18	T/T
apre24	C/T	apre20	T/T
apre37	C/T	apre29	C/T
apre16	C/C	apre14	C/T
apre1	C/C	apre23	C/T
apre2	C/C	apre27	T/T
apre4	C/C	cos2	C/T
apre7	C/C	apre26	C/T
apre10	C/C	apre36	C/T
apre11	C/C	cos11	C/T
cos23	C/T		

Ακολούθως, υπολογίστηκαν οι γονοτυπικές συχνότητες και οι συχνότητες των αλληλομόρφων.

**Υπολογισμός των γονοτυπικών συχνοτήτων:**

$$f(CC) = 17 / 37 = 0.45$$

$$f(CT) = 14 / 37 = 0.37$$

$$f(TT) = 6 / 37 = 0.16$$

**Υπολογισμός των αλληλομορφικών συχνοτήτων:**

$$p = f(C) = f(CC) + \frac{1}{2} f(CT) = 0.45 + (\frac{1}{2} \times 0.37) = 0.635$$

$$q = f(T) = f(TT) + \frac{1}{2} f(CT) = 0.16 + (\frac{1}{2} \times 0.37) = 0.345$$

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πάθηση του δέρματος που επηρεάζει παγκοσμίως το 2-5% του ανθρώπινου πληθυσμού. Οι περισσότερες φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν παλαιότερες συστηματικές θεραπείες όπως η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη και η ακιτρετίνη. Επίσης, φαρμακογενετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για βιολογικούς παράγοντες όπως τον αντι-TNF και τους αναστολείς των IL-12/23. Ωστόσο, αρκετοί ασθενείς δεν αποκρίνονται στις θεραπείες ή παρουσιάζουν πολλές παρενέργειες. Είναι επιτακτική, λοιπόν, η ανάγκη για τη διεξαγωγή φαρμακογενετικών μελετών.

Η συγκεκριμένη φαρμακογενετική μελέτη αφορά ασθενείς που τούς χορηγήθηκε η απρεμιλάστη, μια φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιείται από το 2014 για τη θεραπεία ασθενών με ψωρίαση. Η απρεμιλάστη χορηγείται σε ασθενείς στους οποίους οι συστηματικές θεραπείες δεν έχουν καλά αποτελέσματα, εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες ή υπάρχει κάποια αντένδειξη για τη χορήγηση τους. Ειδικότερα, αποτελεί μια θεραπεία με καλή ανταπόκριση και εμφανίζει ελάχιστες παρενέργειες. Η εργασία στηρίχθηκε στην υπόθεση πως, πιθανόν κάποιοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4B) επηρεάζουν τη δραστηριότητα της απρεμιλάστης, που αποτελεί έναν εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου. Ειδικότερα, η μελέτη περιλαμβάνει γονοτύπηση στο SNP rs6684621 του γονιδίου PDE4B σε τριάντα επτά δείγματα ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση και τούς χορηγήθηκε η απρεμιλάστη. Τα αποτελέσματα στις γονοτυπικές συχνότητες είναι  $f(CC) = 0.45$ ,  $f(CT) = 0.37$  και  $f(TT) = 0.16$ . Επίσης, οι συχνότητες των αλληλομόρφων είναι  $p = f(C) = 0.635$  και  $q = f(T) = 0.345$ . Σύμφωνα με το 1000 Genomes Project Phase 3, στην Ευρώπη οι συχνότητες είναι  $f(C) = 0.42$  και  $f(T) = 0.58$ . Στην Ανατολική Ασία οι συχνότητες είναι  $f(C) = 0.68$  και  $f(T) = 0.32$  και στη Δυτική Ασία οι συχνότητες είναι  $f(C) = 0.61$  και  $f(T) = 0.39$ . Ενώ, στην Αμερική οι συχνότητες είναι  $f(C) = 0.5$  και στην Αφρική οι συχνότητες είναι  $f(C) = 0.51$  και  $f(T) = 0.49$ . Οι συχνότητες των αλληλομόρφων της συγκεκριμένης μελέτης προσεγγίζουν αυτές της Ανατολικής και Δυτικής Ασίας. Εάν τις συγκρίνουμε με την Ευρώπη, υπάρχει απόκλιση καθώς στην Ευρώπη  $f(T) > f(C)$ . Ο αριθμός των δειγμάτων της συγκεκριμένης εργασίας είναι μικρός για να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η συλλογή επιπλέον δειγμάτων, τουλάχιστον εκατό, απαιτείται για τη στατιστική ανάλυση.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arakawa, Akiko, Katherina Siewert, Julia Stöhr, Petra Besgen, Song Min Kim, Geraldine Rühl, Jens Nickel, Sigrid Vollmer, Peter Thomas, Stefan Krebs, Stefan Pinkert, Michael Spannagl, Kathrin Held, Claudia Kammerbauer, Robert Besch, Klaus Dornmair, and Jörg C Prinz. 2015. "Melanocyte Antigen Triggers Autoimmunity in Human Psoriasis." *The Journal of Experimental Medicine* 212(13): 2203–12.
- Caetano-Anollés, D. 2013. "Polymerase Chain Reaction." In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, Elsevier Inc., 392–95.
- Cai, Yihua, Chris Fleming, and Jun Yan. 2012. "New Insights of T Cells in the Pathogenesis of Psoriasis." *Cellular and Molecular Immunology* 9(4): 302–9.
- Capon, Francesca. 2017. "The Genetic Basis of Psoriasis." *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 1–9.
- Chen, L D, and T D Tsai. 2018. "HLA-Cw6 and Psoriasis\*." *British Journal of Dermatology* 178: 854–62.
- Clark, Rachael A., and Thomas S. Kupper. 2006. "Misbehaving Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis." *Journal of Clinical Investigation* 116(8): 2084–87.
- Deng, Yaxiong, Christopher Chang, and Qianjin Lu. 2016. "The Inflammatory Response in Psoriasis : A Comprehensive Review." *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 50: 377–89.
- Dogra, Sunil, and Rahul Mahajan. 2016. "Psoriasis: Epidemiology, Clinical Features, Co-Morbidities, and Clinical Scoring." *Indian Dermatology Online Journal* 7(6): 471.
- Duffin, Kristina Callis, and Gerald G. Krueger. 2009. "Genetic Variations in Cytokines and Cytokine Receptors Associated with Psoriasis Found by Genome-Wide Association." *Journal of Investigative Dermatology* 129(4): 827–33.
- Fala, Loretta. 2015. "Otezla (Apremilast), an Oral PDE-4 Inhibitor, Receives FDA Approval for the Treatment of Patients with Active Psoriatic Arthritis and Plaque Psoriasis." *American health & drug benefits* 8(Spec Feature): 105–10510.
- Fitzgerald, Oliver, and Robert Winchester. 2014. "Emerging Evidence for Critical Involvement of the Interleukin-17 Pathway in Both Psoriasis and Psoriatic Arthritis." *ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY* 66(5): 1077–80.
- Fujita, Hideki. 2013. "The Role of IL-22 and Th22 Cells in Human Skin Diseases." *Journal of Dermatological Science* 72(1): 3–8.
- Garafutdinov, Ravil R., Aizilya A. Galimova, and Assol R. Sakhabutdinova. 2017. "Polymerase Chain Reaction with Nearby Primers." *Analytical Biochemistry* 518: 126–33.
- Garc, A, E Gallo, and T Cabaleiro. 2013. "The Relationship between Tumour Necrosis Factor ( TNF ) - a Promoter and IL12B / IL-23R Genes Polymorphisms and the Efficacy of Anti-TNF- a Therapy in Psoriasis : A Case – Control Study." *British Journal of Dermatology*: 819–29.

- Gariyban, Lilit, and Nidhi Avashia. 2013. "Polymerase Chain Reaction." In *Journal of Investigative Dermatology*, , 133.
- Harden, Jamie L., James G. Krueger, and Anne M. Bowcock. 2015. "The Immunogenetics of Psoriasis: A Comprehensive Review." *Journal of Autoimmunity* 64: 66–73.
- Hawkes, Jason E., Tom C. Chan, and James G. Krueger. 2017. "Psoriasis Pathogenesis and the Development of Novel Targeted Immune Therapies." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140(3): 645–53.
- Hayashi, Kenshi. 1992. "PCR-SSCP: A Method for Detection of Mutations." *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 9(3): 73–79.
- Hwang, Samuel T, Tamar Nijsten, and James T Elder. 2017. "Recent Highlights in Psoriasis Research." *Journal of Investigative Dermatology* 137(3): 550–56.
- Kim, Whan B., Dana Jerome, and Jensen Yeung. 2017. "Diagnosis and Management of Psoriasis." *Canadian Family Physician* 63(4): 278–85.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, and Yong Hoon Kim. 2012. "Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments." *Journal of Visualized Experiments* (62): 1–5.
- Lønnberg, A S, L Skov, A Skytthe, K O Kyvik, O B Pedersen, S F Thomsen, and Ann Sophie Lønnberg. 2013. "Heritability of Psoriasis in a Large Twin Sample." *British Journal of Dermatology* 169: 412–416.
- Di Meglio, Paola, Antonella Di Cesare, Ute Laggner, Chung Ching Chu, Luca Napolitano, Federica Villanova, Isabella Tosi, Francesca Capon, Richard C. Trembath, Ketty Peris, and Frank O. Nestle. 2011. "The IL23R R381Q Gene Variant Protects against Immune-Mediated Diseases by Impairing IL-23-Induced Th17 Effector Response in Humans." *PLoS ONE* 6(2): 1–10.
- Meglio, Paola Di, Federica Villanova, and Frank O Nestle. 2014. "Psoriasis." *Cold Spring Harb Perspect Med* 4: 1–30.
- Meinardi, M. M H M, W. Westerhof, and J. D. Bos. 1987. "Generalized Pustular Psoriasis (von Zumbusch) Responding to Cyclosporin A." *British Journal of Dermatology* 116(2): 269–70.
- Michalek, I. M., B. Loring, and S. M. John. 2017. "A Systematic Review of Worldwide Epidemiology of Psoriasis." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 31(2): 205–12.
- Moustafa, Farah, and Steven R Feldman. 2014. "A Review of Phosphodiesterase-Inhibition and the Potential Role for Phosphodiesterase 4-Inhibitors in Clinical Dermatology." *Dermatology Online Journal* 20(5): 1–10.
- Mullis, Kary B., Henry A Erlich, Norman Arnheim, Glenn T Horn, Randall K Saiki, and Stephen J Scharf. 1987. "PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR-CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES." *United States Patent* (19).
- Myers, Wendy A, Alice B Gottlieb, and Philip Mease. 2006. "Psoriasis and Psoriatic Arthritis :



- Clinical Features and Disease Mechanisms.” *Clinics in Dermatology* 24: 438–47.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. “Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(8): 2766–70.
- Parisi, Rosa, Deborah P.M. Symmons, Christopher E.M. Griffiths, and Darren M. Ashcroft. 2013. “Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence.” *Journal of Investigative Dermatology* 133(2): 377–85.
- Pincelli, Carlo, Peter Schafer, Lars French, Matthias Augustin, and James Krueger. 2018. “Mechanisms Underlying the Clinical Effects of Apremilast for Psoriasis.” *Journal of Drugs in Dermatology* 17(8): 835–40.
- Prieto-Pérez, Rocío, Teresa Cabaleiro, Esteban Daudén, Dolores Ochoa, Manuel Roman, and Francisco Abad-Santos. 2013. “Genetics of Psoriasis and Pharmacogenetics of Biological Drugs.” *Autoimmune Diseases* 2013.
- Puig, L, A Julià, and S Marsal. 2014. “The Pathogenesis and Genetics of Psoriasis.” *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 105(6): 535–45.
- Raychaudhuri, Smriti K., Emanuel Maverakis, and Siba P. Raychaudhuri. 2014. “Diagnosis and Classification of Psoriasis.” *Autoimmunity Reviews* 13(4–5): 490–95.
- Schafer, P H, A Parton, L Capone, D Cedzik, H Brady, J F Evans, H Man, G W Muller, D I Stirling, and R Chopra. 2014. “Apremilast Is a Selective PDE4 Inhibitor with Regulatory Effects on Innate Immunity.” *Cellular Signalling* 26(9): 2016–29.
- Schafer, Peter. 2012. “Apremilast Mechanism of Action and Application to Psoriasis and Psoriatic Arthritis.” *Biochemical Pharmacology* 83(12): 1583–90.
- Schafer, Peter H., Francesca Truzzi, Anastasia Parton, Lei Wu, Jolanta Kosek, Ling Hua Zhang, Gerald Horan, Annalisa Saltari, Marika Quadri, Roberta Lotti, Alessandra Marconi, and Carlo Pincelli. 2016. “Phosphodiesterase 4 in Inflammatory Diseases: Effects of Apremilast in Psoriatic Blood and in Dermal Myofibroblasts through the PDE4/CD271 Complex.” *Cellular Signalling* 28(7): 753–63.
- Sekiya, Takao. 1996. “Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis.” In *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, , 281–90.
- Spadaccini, Marco, Silvia D’Alessio, Laurent Peyrin-Biroulet, and Silvio Danese. 2017. “PDE4 Inhibition and Inflammatory Bowel Disease: A Novel Therapeutic Avenue.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(6): 1–14.
- Stellwagen, Nancy C. 2010. “Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution.” *NIH Public Access* 30(Suppl 1): 1–14.
- Tabarkiewicz, Jacek, Katarzyna Pogoda, Agnieszka Karczmarczyk, Piotr Pozarowski, and Krzysztof Giannopoulos. 2015. “The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases.” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 63(6): 435–49.
- Teunissen, Marcel B M, Cock W Koomen, Rene De Waal Malefyt, Eddy A Wierenga, and Jan D

- Bos. 1998. "Interleukin-17 and Interferon- $\gamma$  Synergize in the Enhancement of Proinflammatory Cytokine Production by Human Keratinocytes." *Journal of Investigative Dermatology* 111(4): 645–49.
- Tsoi, Lam C, Eva Ellinghaus, Philip E Stuart, Francesca Capon, Trilokraj Tejasvi, Hyun M Kang, Michael H Allen, Sylviane Lambert, Stephan Weidinger, Johann E Gudjonsson, Sulev Koks, and Külli Kingo. 2015. "New Psoriasis Susceptibility Loci." *HHS Public Access* 5(6): 701–18.
- Tutuncu, Zuhre, Arthur Kavanaugh, Nathan Zvaifler, Maripat Corr, Reena Deutsch, and David Boyle. 2005. "Fc $\gamma$  Receptor Type IIIA Polymorphisms Influence Treatment Outcomes in Patients with Inflammatory Arthritis Treated with Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Blocking Agents." *Arthritis and Rheumatism* 52(9): 2693–96.
- Vasilopoulos, Y, C Sarri, E Zafiriou, A Patsatsi, C Stamatis, E Ntoumou, I Fassos, A Tsalta, and A Karra. 2014. "ORIGINAL ARTICLE A Pharmacogenetic Study of ABCB1 Polymorphisms and Cyclosporine Treatment Response in Patients with Psoriasis in the Greek Population." *The Pharmacogenomics Journal* (June): 523–25.
- Warren, Richard B, Rhodri LI Smith, Emanuela Campalani, Steve Eyre, Catherine H Smith, Jonathan N W N Barker, Jane Worthington, and Christopher E M Griffiths. 2008. "Genetic Variation in Efflux Transporters Influences Outcome to Methotrexate Therapy in Patients with Psoriasis." *Journal of Investigative Dermatology* 128(8): 1925–29.
- Wawer, Cathrin, Georg Meyerl, Gerard Muyzer, and H Rüggeberg. 1995. "A Simple and Rapid Electrophoresis Method to Detect Sequence Variation in PCR-Amplified DNA Fragments." *Nucleic Acids Research, Oxford University Press* 23(23): 4928–29.
- Wcisło-Dziadecka, Dominika, Martyna Zbiciak-Nylec, Ligia Brzezińska-Wcisło, Katarzyna Bebenek, and Agata Kaźmierczak. 2017. "Newer Treatments of Psoriasis Regarding IL-23 Inhibitors, Phosphodiesterase 4 Inhibitors, and Janus Kinase Inhibitors." *Dermatologic Therapy* 30(6): 1–8.
- Weigle, Nancy, and Sarah Mcbane. 2013. "Psoriasis." *American Academy of Family Physicians* 87(9): 626–33.
- Young, Helen S, Angela M Summers, Ian R Read, David A Fairhurst, Darren J Plant, Emanuela Campalani, Catherine H Smith, Jonathan N W N Barker, Michael J Detmar, Paul E C Brenchley, and Christopher E M Griffiths. 2006. "Interaction between Genetic Control of Vascular Endothelial Growth Factor Production and Retinoid Responsiveness in Psoriasis." *Journal of Investigative Dermatology* 126(43): 453–59.
- Zeng, Jinrong, Shuaihantian Luo, Yumeng Huang, and Qianjin Lu. 2017. "Critical Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Psoriasis." *Journal of Dermatology* 44(December 2016): 863–72.
- Zhang, Peng, Ming Zhao, Gongping Liang, Guangliang Yin, Dan Huang, Fengxia Su, Hanyue Zhai, Litao Wang, Yuwen Su, and Qianjin Lu. 2013. "Whole-Genome DNA Methylation in Skin Lesions from Patients with Psoriasis Vulgaris." *Journal of Autoimmunity* 41: 17–24.